



AUSLEGESCHRIFT 1 079 857

L 31634 IX/421

ANMELDETAG: 3. NOVEMBER 1958

BEKANNTMACHUNG
DER ANMELDUNG
UND AUSGABE DER
AUSLEGESCHRIFT: 14. APRIL 1960

1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur photometrischen Bestimmung kleiner Mengen gelöster Stoffe, die in Form abgemessener Lösungsproben auf einen Träger aufgebracht sind.

Die bekannten Verfahren, bei denen man Stofflösungen mißt, die sich in Glasküvetten befinden, haben den Nachteil, daß eine bestimmte Mindestmenge an Lösung vorhanden sein muß. Diese Menge hängt von der Konzentration des zu messenden Stoffes in der Lösung ab und darf auch bei Mikroküvetten und hoher Stoffkonzentration nicht weniger als 0,1 bis 0,2 ml betragen. Erfahrungsgemäß stehen solche Mengen aber bei biologischen Versuchen selten zur Verfügung, weswegen eine photometrische Auswertung bisher oft nicht möglich war.

Ein weiteres bekanntes Verfahren betrifft die photometrische Bestimmung der Einzelkomponenten von Stoffgemischen, die durch Elektrophorese oder durch Chromatographie auf Streifen von porösem Material getrennt und gegebenenfalls angefärbt sind. Das Verfahren besteht darin, daß man die betreffenden Streifen durch Einbetten in eine Flüssigkeit, die den gleichen oder etwa den gleichen Brechungsindex aufweist wie das Material, aus dem die Streifen hergestellt sind, lichtdurchlässig macht und anschließend die Extinktion nach den üblichen quantitativen Methoden mißt.

Nach dem letztgenannten Verfahren können Stoffe, die sich auf einem porösen Träger befinden, auch ohne vorausgehende Elektrophorese oder Chromatographie photometrisch analysiert werden. Dabei stört, daß der Träger trotz Einbetten in eine Flüssigkeit von gleichem Brechungsindex nicht vollkommen durchstrahlbar wird, sondern nur ölpapierähnliche Beschaffenheit annimmt. Als Folge zeigt sich beim Photometrieren ein im Träger örtlich ungleicher Lichtverlust, der die Extinktion der aufgetragenen Stoffprobe überlagert und das Messen geringer Stoffmengen ungenau macht. Für Eiweiß, das mit Amidoschwarz angefärbt ist, beträgt die meßbare Mindestmenge daher bestenfalls 1 bis 2 Gamma (0,00002 g), so daß das Verfahren für die Bestimmung kleinster Stoffmengen ebenfalls nicht in Frage kommt.

Die Erfindung bezweckt, den Mangel an photometrischen Mikromethoden zu beseitigen, und schlägt ein Verfahren vor, das es unter Verwendung von Probenträger und Küvette ermöglicht, kleinste Mengen gelöster Stoffe photometrisch zu messen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kennzeichnet sich dadurch, daß ein fasriger oder poröser Träger zur Anwendung kommt, der in der Küvette durch ein Lösungsmittel infolge beginnender Auflösung durch Aufhebung der Lichtstreuenden und der doppelbrechenden Eigenschaft seines Materials optisch gleichmäßig durchstrahlbar wird, während die Struktur des Trä-

Verfahren

zur photometrischen Bestimmung
kleiner Mengen gelöster Stoffe
und Küvette
zur Durchführung des Verfahrens

Anmelder:

Dr. Erich Letterer,
Tübingen, Liebermeisterstr. 8

Dr. med. Werner Heinzel und Dr. med. Volker Neuhoff,
Tübingen,
sind als Erfinder genannt worden

2

gers so weit erhalten bleibt, daß die Probe ihre Lage beibehält, und daß das Lösungsmittel gleiche Absorptionseigenschaften besitzt wie der in Auflösung begriffene Träger.

Gemäß der Erfindung wird auf den aus fasrigem oder porösem Werkstoff bestehenden Träger, der saugfähig ist, die zu bestimmende Lösungsprobe aufgetragen. Nach Antrocknen des in ihr enthaltenen Stoffes wird der Träger in einer durchsichtigen Küvette mit einem Lösungsmittel versetzt, das zwar den Träger, nicht aber den zu messenden Stoff löst oder zerstört. Das Versetzen des Trägers mit dem Lösungsmittel hebt die lichtstreuende und doppelbrechende Wirkung des Trägers auf, so daß er durchsichtig und streulichtfrei durchstrahlbar wird. Bei Wahl eines geeigneten Mengenverhältnisses von Träger und Lösungsmittel wird ein Zustand beginnender Lösung erreicht, in dem die optimale Durchstrahlbarkeit bereits erreicht, jedoch die Struktur des Trägers noch vorhanden ist. Dadurch behält der zu bestimmende Stoff, der in Form kleinster Partikel im Träger liegt und infolge seiner Unlöslichkeit im Träger-Lösungsmittel-Gemisch nicht diffundieren kann, seine beim Aufbringen auf den Träger zustande gekommene Lage bei und wird mit einem dem Probenfleck nach Form und Größe angepaßten Meßstrahl photometrisch gemessen.

Das Verfahren gemäß der Erfindung ist von der Küvettengröße unabhängig und erlaubt, sehr kleine Lösungsmengen zu analysieren. Die untere Grenze der Anwendbarkeit ist durch die Menge des gelösten Stof-

fes gegeben und liegt einige Zehnerpotenzen unter der Erfassungsgrenze der bekannten photometrischen Verfahren. Beispielsweise können Eiweißbestimmungen an 0,2 Mikroliter (0,0002 ml) Lösung durchgeführt werden, wobei nach Anfärben mit Amidoschwarz noch einige Hundertstel Gamma Eiweiß meßbar sind.

Dadurch, daß die Lösungsproben gemäß des vorgeschlagenen Verfahrens auf fasrige oder poröse Träger aufgebracht werden, breiten sie sich entsprechend der großen Oberfläche der Trägerstruktur auf einen begrenzt kleinen Raum aus und geben, auch wenn sie ungewöhnlich kleine Stoffmengen enthalten, beispielsweise einige Hundertstel Gamma Eiweiß, eine genügend hohe Absorption, um hinreichend genau messen zu können.

Die für die Auswertung wichtige, gleichmäßige Verteilung der Probe auf dem Träger hängt von dessen Saugfähigkeit für die Stofflösung ab. Um nicht saugfähige Träger saugfähig zu machen oder die Saugfähigkeit begrenzt saugfähiger Träger zu verbessern, schlägt die Erfindung in einem weiteren Verfahrensschritt vor, den Träger vor Aufbringen der Stoffprobe einer chemischen Behandlung zu unterziehen, die das Trägermaterial für die Stofflösung netzbar macht bzw. ihm eine geeignete Oberflächenspannung verleiht. Beispielsweise wird die Saugfähigkeit für wäßrige Lösungen bei Verwendung von Polyvinylchlorid als Trägermaterial durch Imprägnation mit Ölsäure erreicht.

Nach Antrocknen der Lösungsprobe liegt der zu messende Stoff in Form kleinster Partikel zwischen den Fasern bzw. in den Poren des Trägers und gibt ein für ihn charakteristisches Absorptionsspektrum, das durch Lichtverluste infolge der lichtstreuenden Wirkung der Partikel geringfügig überlagert wird. Der dadurch beim Messen der Proben entstehende Fehler ist, sofern es sich um Lösungen eines bestimmten Konzentrationsbereiches handelt, beispielsweise um Eiweißlösungen zwischen 0,01 und 0,5 %, ohne Bedeutung. Er kann aber, wenn erforderlich, durch Verwendung von Träger-Lösungsmittel-Paaren, deren Gemisch den gleichen Brechungsindex aufweist wie die Stoffpartikel, ausgeschaltet werden.

Ist die Absorption der Stoffprobe zu gering, um brauchbare Meßwerte zu geben, oder liegt sie in einem ungünstigen Wellenbereich, so kann sie durch chemisches Umsetzen oder Anfärben des Stoffes in geeigneter Weise verbessert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, schlägt die Erfindung vor, nach den bekannten Methoden der sogenannten Tüpfelanalyse zu verfahren und beispielsweise Eiweiß mit Amidoschwarz zu färben.

Ein weiterer Verfahrensschritt gemäß der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß die fleckförmig im Träger liegende Stoffprobe durch Vorbeiführen an einem dem Probenfleck angepaßten Meßstrahl photometrisch gemessen wird.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das aus einem der bekannten Spektralphotometer, beispielsweise der Firma Zeiss oder der Firma Beckmann, erhaltene monochromatische Licht durch Kombination geeigneter Linsen und Blenden so geformt werden, daß in der Meßebe, in der sich die Küvette mit dem Probenträger und dem Lösungsmittel befindet, ein Meßstrahl entsteht, dessen Querschnitt der Form und der Größe des zu untersuchenden Probenfleckes optimal angepaßt ist. Die Einstellung der Stoffprobe im Meßstrahl wird mit Hilfe eines Justiermikroskopes und einer entsprechenden Beleuchtungseinrichtung vorgenommen, und anschließend wird die Küvette mit

Träger und Stoffprobe in schrittweisem Transport über genau bestimmte Wegstrecken, gegebenenfalls in Bruchteilen von Millimetern, an dem der Probe angepaßten Lichtbündel vorbeigeführt und dabei die Extinktion der Probe gemessen.

Gemäß weiterer Erfindung kann als Träger ein papierartig verarbeiteter Kunststoff, beispielsweise Polyvinylchlorid, zur Anwendung kommen.

Besonders vorteilhaft ist es, wenn erfindungsgemäß als Lösungsmittel für den Träger Nitrobenzol oder Tetrahydrofuran verwandt wird.

Die erwähnten geringen Stoffmengen können nach dem neuen Verfahren nicht nur photometrisch gemessen, sondern auch spektralanalytisch untersucht werden.

Außer zur Analyse im sichtbaren Licht eignet sich das Verfahren bei Verwendung von Träger-Lösungsmittel-Paaren, deren Gemisch das Licht niederer Wellenlängen nicht oder nur gering absorbiert, ebenso zur Stoffanalyse im ultravioletten Bereich. Um Fehler zu vermeiden, muß in diesem Fall die möglicherweise lichtstreuende Wirkung der Partikel des zu messenden Stoffes durch Wahl eines Träger-Lösungsmittelgemisches von entsprechendem Brechungsindex sorgfältig ausgeschaltet werden.

Die Erfindung bringt schließlich eine Küvette zur Durchführung des neuen Verfahrens in Vorschlag, die durch zwei parallel zueinander und in einem bestimmten Abstand voneinander angeordnete, durchsichtige Platten, vorzugsweise Glasplatten, gekennzeichnet ist. Die Platten sind an beiden Seiten und am unteren Rand unter Bildung von Behälterwänden miteinander verbunden, wobei die Tiefe der Küvette, gleich der Abstand der Platten voneinander, so gewählt ist, daß bei Verwendung eines Trägers, dessen Abmessung der Höhe und Breite des Küvettenraumes entspricht, das erforderliche Mischungsverhältnis zwischen Träger und Lösungsmittel zustande kommt.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung können die Platten, die die Küvette bilden, zur Ermöglichung des leichten und luftblasenfreien Einführens des Trägers in den mit Lösungsmittel gefüllten Küvettenraum an ihren oberen Rändern unter ständiger Erweiterung ihres gegenseitigen Abstandes abgebogen und im Querschnitt keilförmig auslaufend ausgebildet sein.

Das Versetzen des Trägers mit dem Lösungsmittel wird in der Küvette vorgenommen, indem diese vor Einführen des Trägers mit dem Lösungsmittel gefüllt wird.

Um die Küvette nach Gebrauch mühelos reinigen zu können, wird erfindungsgemäß vorgeschlagen, ihre Seitenwände mit nur einer der beiden Platten fest zu verbinden und die andere abnehmbar aufzulegen.

Beispiel

Eiweißbestimmung an einer 0,01 bis 0,5 %igen Lösung, Probenmenge 0,2 bis 5,0 Mikroliter (0,0002 bis 0,005 ml), Erfassungsgrenze 0,02 Gamma (0,00000002 g).

Ein 40 x 40 mm großer Kunststoffträger, beispielsweise »Rhovyl« der Firma Schleicher & Schüll, Dassel, wird mit Ölsäure durch Aufsaugen einer 2 %igen Ölsäurelösung in Äther und nachfolgendes Abdampfen des Äthers imprägniert. Sodann wird die eiweißhaltige Lösungsprobe aufgetragen und angetrocknet und danach das auf dem Träger befindliche Eiweiß in einer gesättigten Amidoschwarzlösung in Eisessig-Methanol (1:10) zehn Minuten lang gefärbt. Die vom Eiweiß nicht gebundene Farbe wird in mehrfach erneuertem Eisessig-Methanol (1:10) ausgewaschen, worauf das

Trocknen des Trägers von der Waschflüssigkeit folgt. Eine innen 40 mm breite und 40 mm hohe sowie 0,6 mm tiefe Glasküvette wird mit Nitrobenzol gefüllt und darauf der Träger in die Küvette eingeführt. Nach vierzig Minuten ist der Träger optisch gleichmäßig durchstrahlbar, und die Küvette wird in den Strahlengang eines Spektralphotometers gebracht. Durch schrittweisen Transport wird die Probe mit einem Meßstrahl von bestimmtem Querschnitt abgetastet und die Extinktion aus den pro Meßschritt erhaltenen Einzelwerten errechnet.

In der Zeichnung ist eine Eichkurve sowie ein Linsen- und Blendensystem und eine Küvette zur Durchführung des Verfahrens nach der Erfindung beispielsweise dargestellt. Es zeigt

Fig. 1 eine Eichkurve,

Fig. 2 das Linsen- und Blendensystem in schematischer Darstellung,

Fig. 3 eine Küvette in Ansicht und

Fig. 4 eine Küvette im Schnitt nach der Linie IV-IV in Fig. 3.

Aus der in Fig. 1 ersichtlichen Eichkurve ist die Eiweißmenge zu entnehmen, die der gefundenen Extinktion entspricht. Die Eichkurve gilt für Werte zwischen 0,02 und 12,5 Gamma (0,00000002 und 0,0000125 g) Eiweiß.

Mit 1 ist in Fig. 2 ein Monochromator der Firma Zeiss oder der Firma Beckmann bezeichnet, der einen Austrittsspalt 2 für monochromatisches Licht besitzt. Hinter dem Spalt 2 befindet sich eine Linse 3 zur Abbildung des Monochromatorspaltes in einer Blenden-ebene, in der ein Doppelspalt 4, bestehend aus einer Schlitzblende mit verstellbaren Höhen- und Seitenbacken 5 bzw. 6, angebracht ist. Die Verstellung der Blendenbacken wird mit Hilfe der Stellschrauben 7 bzw. 8 vorgenommen, und das Justieren der Schlitzblende im Strahlengang erfolgt mit der Stellschraube 9.

Hinter der Schlitzblende ist ein Schrägspiegel 10 angeordnet, der von einer Lichtquelle 11 bestrahlt wird. Im Strahlengang folgt eine Linse 12, die den ausgeblendeten Meßstrahl in der Meßebeine 13 abbildet. In der Meßebeine 13 ist ein Probenträger 14 mit Halterung für die angeordnete Glasküvette 15 vorgesehen. Der Probenträger steht in einer Einrichtung 16, die dem Justieren der Probe im Meßstrahl dient.

Der Probenträger ist mit der Justiereinrichtung auf einem nicht gesondert dargestellten Schlitten angeordnet, der mit einem Feintrieb 17 und einem Rast versehen ist, um die Proben schrittweise in bestimmten Wegstrecken durch den Meßstrahl führen zu können.

Hinter der Meßebeine befindet sich ein klappbarer Schrägspiegel 18, mit dessen Hilfe das Justieren der Probe im Meßstrahl durch ein Mikroskop 19 beobachtet wird.

Dem Spiegel 18 ist der an sich bekannte lichtelektrische Empfänger 20, beispielsweise der Firma Zeiss oder der Firma Beckmann, nachgeschaltet.

Der Spiegel 10 ist mit einem Durchlaß für den Meßstrahl versehen. Die Lichtquelle 11 dient zum Beleuchten der Proben während des Justierens.

Die die Küvette veranschaulichenden Fig. 3 und 4 zeigen, daß die beiden durchsichtigen Platten 21, 22 parallel zueinander mit Abstand voneinander angeordnet und an den Seiten sowie am unteren Rand unter Bildung schmaler Wände 23, 24 miteinander verbunden sind. Der Abstand zwischen den Platten 21, 22 ist so gewählt, daß durch Einbringen eines der Küvettenhöhe und -breite entsprechend abgemessenen Trägers 25 in die mit Lösungsmittel 26 gefüllte Küvette das

erforderliche Mischungsverhältnis zwischen Träger und Lösungsmittel zustande kommt. Daß die Behälterwände mit nur einer der Platten fest verbunden sind, während die andere, um die Küvette leicht reinigen zu können, abnehmbar aufliegt, ist in den Zeichnungen nicht eigens dargestellt.

Aus Fig. 4 ist ersichtlich, daß die Platten 21, 22 der Küvette an ihren oberen Rändern 21a, 22a unter ständiger Erweiterung des Abstandes zwischen ihnen keilförmig auslaufend ausgebildet sind. Auf diese Weise wird ein leichtes und luftblasenfreies Einführen des Trägers 25 in die mit Lösungsmittel 26 gefüllte Küvette ermöglicht. Das luftblasenfreie Mischen von Träger und Lösungsmittel ist für eine fehlerfreie Auswertung der Proben unerlässlich.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur photometrischen Bestimmung kleiner Stoffmengen, die in gelöster Form auf einem saugfähigen Träger aufgebracht und in einer Küvette photometrisch ausgewertet werden, dadurch gekennzeichnet, daß ein fasriger oder poröser Träger zur Anwendung kommt, der in der Küvette durch ein Lösungsmittel infolge beginnender Auflösung durch Aufhebung der lichtstreuenden und der doppelbrechenden Eigenschaft seines Materials optisch gleichmäßig durchstrahlbar wird, während die Struktur des Trägers so weit erhalten bleibt, daß die Probe ihre Lage beibehält, und daß das Lösungsmittel gleiche Absorptionseigenschaften besitzt wie der in Auflösung begriffene Träger.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger zur Erzielung oder Verbesserung seiner Saugfähigkeit vor dem Aufbringen der gelösten Stoffprobe einer chemischen Behandlung unterzogen wird, die das Trägermaterial für das zur Anwendung kommende Stofflösungsmittel netzbar macht, z. B. bei wäßrigen Lösungsmitteln durch Imprägnation mit Ölsäure.

3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die auf den Träger aufgebrachte Stoffprobe nach dem Antrocknen zur Erzielung einer höheren oder in einem günstigeren Wellenlängenbereich gelegenen Absorption einer chemischen Umsetzung oder Anfärbung unterzogen wird.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der zu untersuchende, fleckförmig auf dem Träger liegende Stoff mit einem in seinem Querschnitt durch ein Linsen- und Blendensystem der Form und Größe des Fleckes angepaßten Meßstrahl in an sich bekannter Weise abgetastet und photometrisch gemessen wird.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Kunststoffträger, beispielsweise aus Polyvinylchlorid, zur Anwendung kommt.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittel für den Träger Nitrobenzol zur Anwendung kommt.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittel für den Träger Tetrahydrofuran zur Anwendung kommt.

8. Küvette zur Durchführung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 7, gekennzeichnet durch zwei parallel zueinander und in einem bestimmten Abstand voneinander angeordnete, durchsichtige Platten (21, 22), vorzugsweise Glasplatten, die an

den Seiten und am unteren Rand unter Bildung schmaler Behälterwände (23, 24) miteinander verbunden sind, wobei der Abstand zwischen den Platten so gewählt ist, daß bei Einführen eines der Küvettenhöhe und -breite entsprechend abgemessenen Trägers in die mit Lösungsmittel gefüllte Küvette das erforderliche Mischungsverhältnis zwischen beiden zustande kommt.

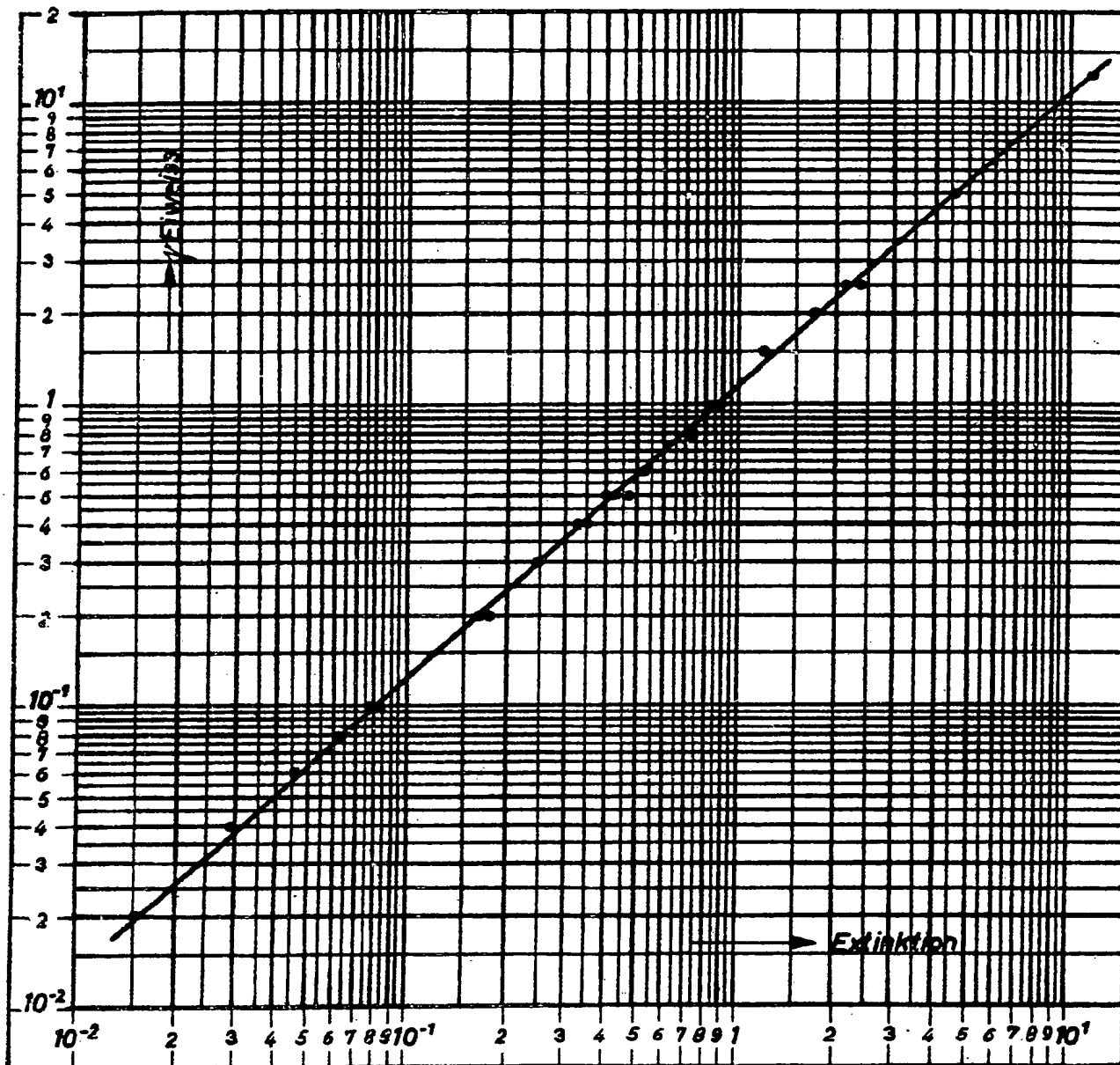
9. Küvette nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß eine der Küvettenplatten zur Erleichterung der Reinigung der Küvette an den seit-

lichen Behälterwänden (23, 24) abnehmbar aufliegt.

10. Küvette nach den Ansprüchen 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Platten (21, 22) zur Ermöglichung des leichten und luftblasenfreien Einführens des Trägers (25) in die mit Lösungsmittel gefüllte Küvette an ihren oberen Rändern (21 a, 22 a) unter ständiger Erweiterung ihres gegenseitigen Abstandes abgebogen und/oder im Querschnitt keilförmig auslaufend ausgebildet sind.

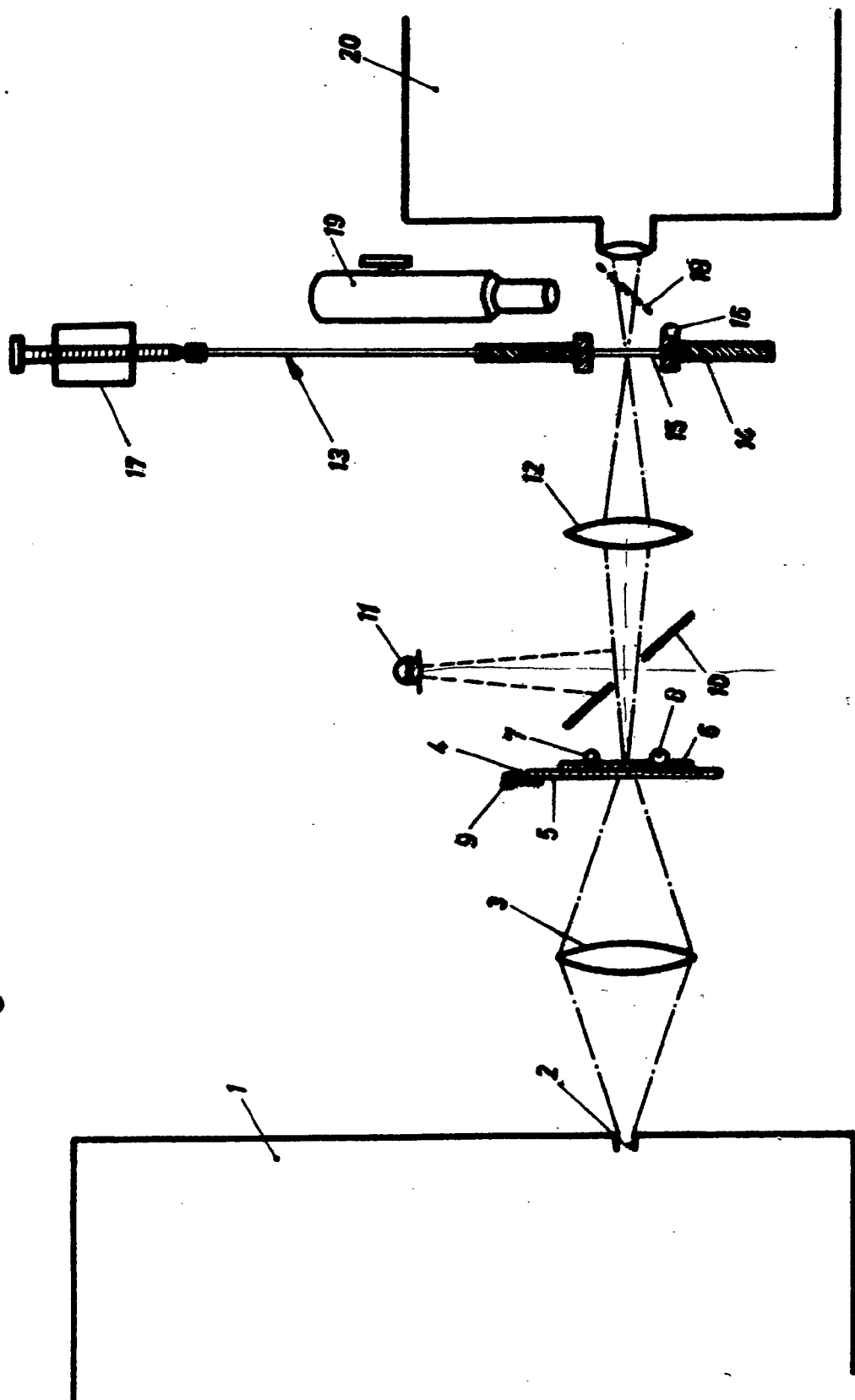
Hierzu 1 Blatt Zeichnungen

Fig.1



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 2



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 4

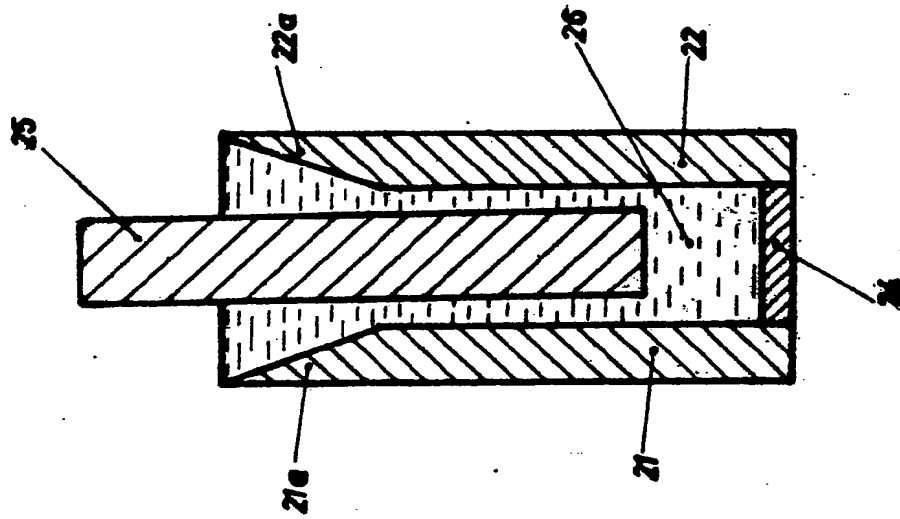
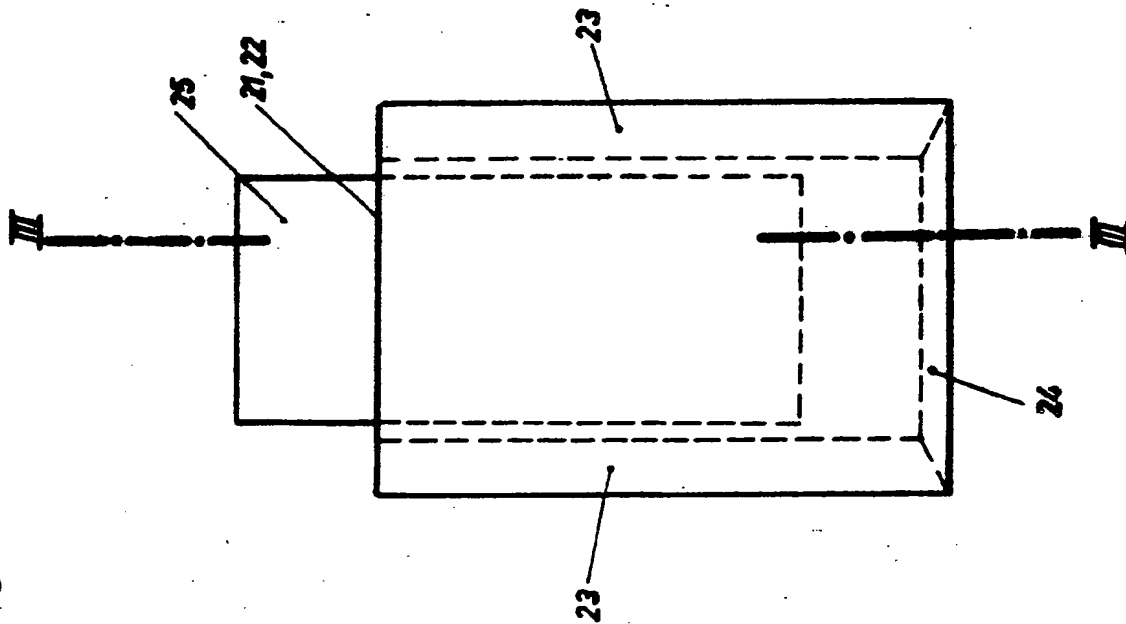


Fig. 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)